



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اهمیت فارماکوفور ۵،۴،۳-تری متوکسی فنیل در ترکیب

۴-{[(۲،۳-dichlorophenyl)methylidene]amino}-۵-[(۳،۴،۵-

trimethoxyphenyl) methyl]-۲H-۱،۲،۴-triazole-۳-thione

بر اثرات سیتوتوکسیک و مهار کنندگی پلیمریزاسیون توبولین

توسط:

مریم اسفندیاری

اساتید راهنما:

دکتر عالیہ عامری

دکتر حمید فروتن فر

شماره پایان نامه:

آذرماه ۱۳۹۷



**Kerman University of Medical Sciences**

**Faculty of Pharmacy**

**Pharm. D Thesis**

**Title:**

**Evaluation of the importance of 3,4,5-trimethoxyphenyl pharmacophore of -  
{[(2,3-dichlorophenyl)methylidene]amino} -5-[(3,4,5-  
trimethoxyphenyl)methyl]-2H-1,2,4-triazole-3-thione for cytotoxicity effects  
and inhibition of tubulin polymerization**

**By:**

**Maryam Esfandiari**

**Supervisors:**

**Dr. Alieh Ameri**

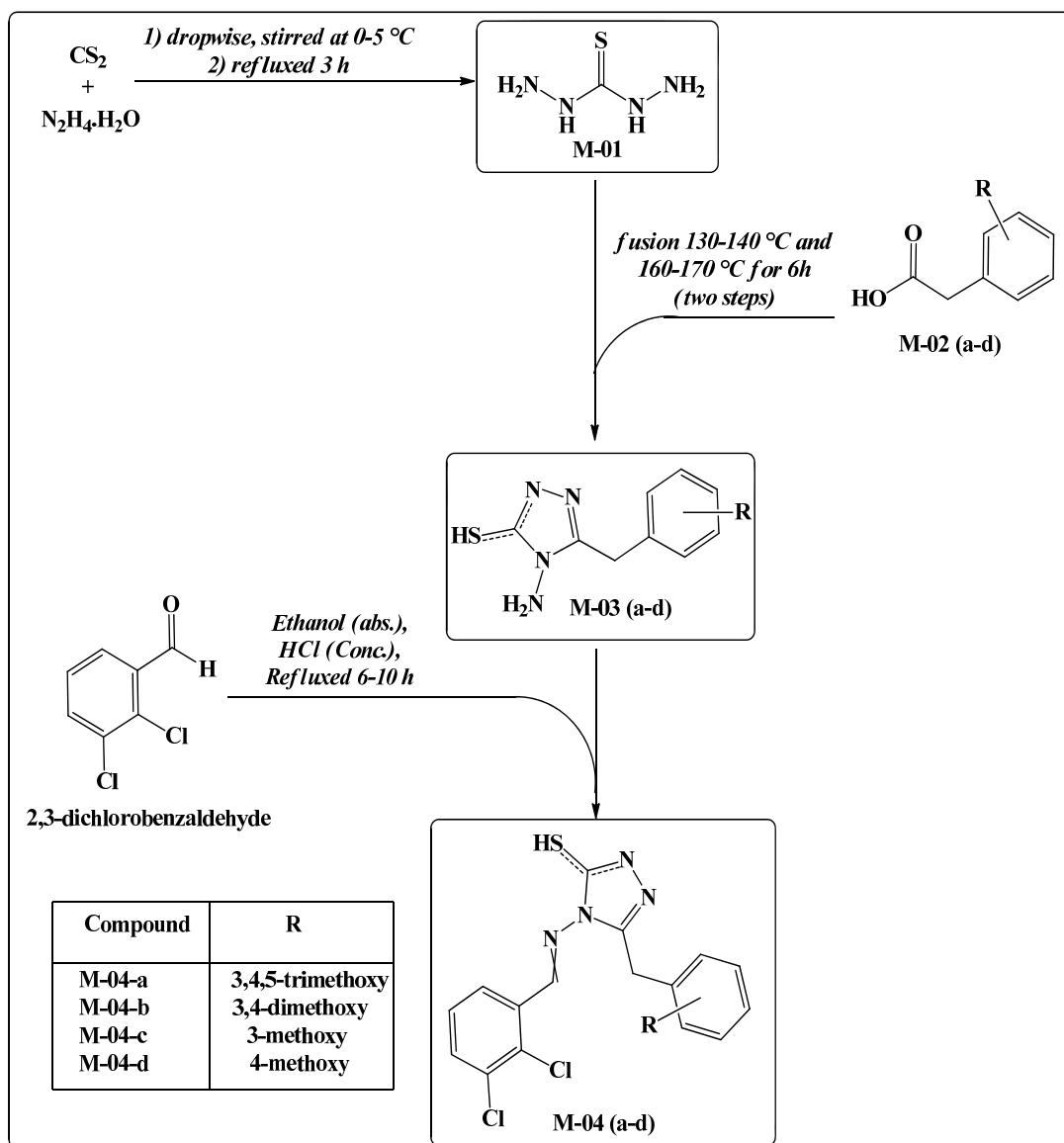
**Dr. Hamid Forootanfar**

**December ۲۰۱۸**

## خلاصه فارسی:

**هدف:** طراحی و سنتز ترکیبات با مکانیسمهای جدید مهار رشد سلولهای سرطانی به یکی از زمینه‌های تحقیقاتی مهم تبدیل شده است. در تحقیق حاضر که در ادامه پروژه های قبلی صورت گرفته، اهمیت حضور فارماکوفور ۵،۴،۳-تری متوکسی فنیل (TMP) در ایجاد اثر سمیت سلولی و قدرت مهار کنندگی پلیمریزاسیون توبولین یک سری از شیف بازهای هیبریدی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** شیف بازهای طراحی شده با طرح ارائه شده در شکل زیر سنتز شدند و خصوصیات آنها از جمله نقطه ذوب، طیفهای FTIR،  $^1\text{H}$ NMR و  $^{13}\text{C}$ NMR آنها تهیه گردید. میزان سمیت سلولی ترکیبات سنتز شده علیه ۴ رده سلولی HT1080، HepG2، MCF7 و A549 که به ترتیب متعلق به سرطانهای فیروسارکوما، کبد، پستان و ریه می باشند به کمک روش MTT Assay بررسی و درصد زنده مانی ( $\text{Viability}\%$ ) در حضور غلظتهای مختلف این ترکیبات و همچنین مقادیر  $\text{IC}_{50}$  مربوطه محاسبه گردید. در مرحله بعد ترکیبات واجد  $\text{IC}_{50}$  مناسب انتخاب و توانایی آنها در مهار پلیمریزاسیون توبولین به کمک کیت متعلق به شرکت Cytoskeleton بررسی شد. درصد مهار پلیمریزاسیون و  $\text{IC}_{50}$  مربوطه در حضور غلظتهای مختلف ترکیبات منتخب محاسبه گردید. در مرحله بعد و به منظور بررسی مکانیسم احتمالی اتصال و محاسبه انرژیهای پیوند ترکیبات منتخب با توبولین از نرم افزار AutoDock و ساختار کریستالی توبولین با کد 1SA0 استفاده شد.



طرح ۱- سنتز مشتقات Schiff base

**یافته‌ها:** بررسی طیف سنجی صورت گرفته نشان داد که ترکیبات مورد نظر سنتز شده اند. نتایج ارزیابی سمیت

سلولی ترکیبات دسته **M-۰۳** نشان داد که فقط ترکیب **M-۰۳-a** ( $IC_{50} = 75/6 \pm 20/5 \mu M$ )، علیه رده سلولی

(HT۱۰۸۰) از این گروه نتیجه مناسب نشان داد و سایر ترکیبات این گروه سمیت سلولی قابل ملاحظه ای بروز

ندادند. از بین ترکیبات دسته **M-۰۴** سه ترکیب **M-۰۴-a** و **M-۰۴-b** و **M-۰۴-d** بر روی رده سلولی

HepG2 به ترتیب  $IC_{50}$  معادل  $15/7 \pm 0/08 \mu M$ ،  $32/2 \pm 3/2 \mu M$  و  $144/76 \pm 4/10 \mu M$  نشان دادند. این سه ترکیب به همراه کلشی سین به عنوان کنترل مثبت در تست مهارکنندگی پلیمریزاسیون توبولین مورد بررسی قرار گرفتند که میزان  $IC_{50}$  آنها به ترتیب  $0/17 \pm 0/01 \mu M$ ،  $11/18 \pm 0/23 \mu M$ ،  $36/72 \pm 1/73 \mu M$  و  $0/19 \pm 0/01$  برای ترکیبات **M-04-a** و **M-04-b** و **M-04-d** و کلشی سین محاسبه گردید.

**نتیجه گیری:** بررسی های صورت گرفته در این مطالعه نشان داد که بین میزان سمیت سلولی و اثر مهار کنندگی پلیمریزاسیون توبولین ترکیبات سنتز شده و همچنین نتایج حاصل از داکینگ ترکیبات از لحاظ میزان انرژی و توانایی اتصال به اسید آمینه سیستئین ۲۴۱ در جایگاه اتصال توبولین رابطه مناسبی وجود داشت و حضور فارماکوفور TMP جهت بروز اثرات سمیت سلولی و مهار کنندگی پلیمریزاسیون توبولین مهم و ضروری می باشد.

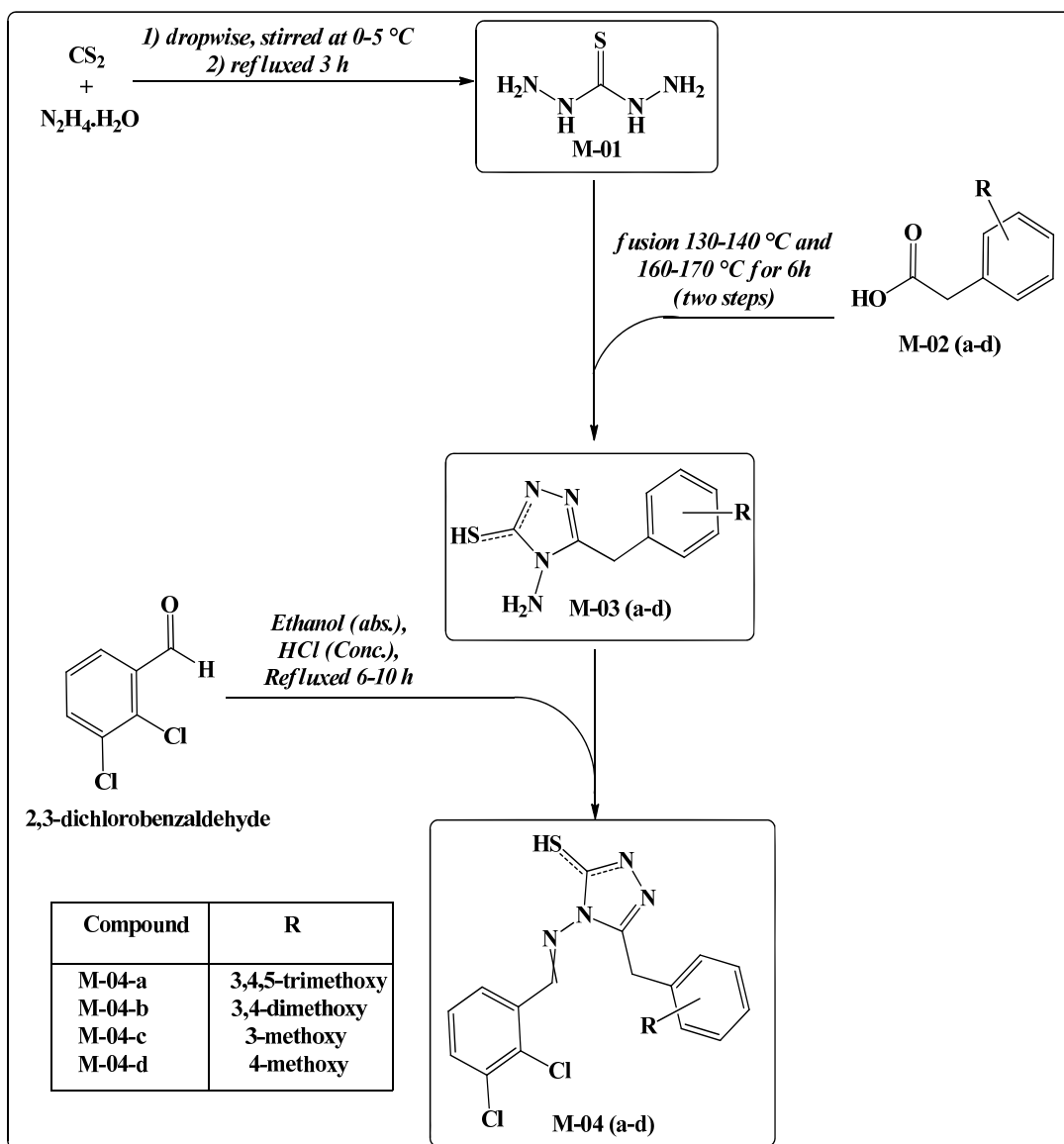
**کلمات کلیدی:** ۵،۴،۳-تری متوکسی فنیل ، شیف بیس، سمیت سلولی، مهار کنندگی پلیمریزاسیون توبولین

## Abstract:

**Purpose:** The design and synthesis of compounds with the novel mechanisms of inhibiting cancer cell growth has become an important field of research. In the present study, which was the following of the previous studies, the importance of the presence of pharmacophore ۳،۴،۵-trimethoxyphenyl (TMP) on the cytotoxic activity and inhibitory activity of tubulin polymerization was evaluated in a series of hybrid structures.

**Materials and methods:** The designed Schiff bases were synthesized according to the scheme presented below and their characteristics including melting point, FTIR,  $^1H$ NMR, and  $^{13}C$ NMR

spectra were determined. The cytotoxicity of the synthesized compounds against the four cell lines of HT1080, HepG2, MCF7, and A549 belonging to fibrosarcoma, liver, breast, and lung cancers, were investigated using the MTT assay method, and the percentage of viability in the presence of different concentrations of these compounds as well as the corresponding IC<sub>50</sub> values were calculated. In the next step, the compounds with appropriate IC<sub>50</sub> were selected and their ability to inhibit tubulin polymerization by means of the kit belonging to the Cytoskeleton Company was investigated. The percentage of inhibition of polymerization and corresponding IC<sub>50</sub> in the presence of different concentrations of the selected compounds were calculated. In the next step, the AutoDock software and crystalline structure of tubulin with the PDB code 1SA0 was used to examine the mechanism of probable binding and calculation of binding energy of the selected compounds to tubulin.



**Scheme 1- Synthesis of Schiff base derivatives**

**Results:** The obtained spectra of attained compounds showed that the desired compounds were synthesized. The results of cytotoxicity effect of **M-13** compounds revealed that only **M-13-a**

( $\text{IC}_{50} = 50.7 \pm 2.5 \mu\text{M}$  against the HT1080 cell line)

exhibited suitable inhibitory effect and the other compounds of this group did not show appropriate cytotoxic effect. Among compounds of the **M-13** group, the three compounds of **M-**

**1**-**2**-a, **1**-**2**-b, and **1**-**2**-d inhibited the HepG2 cell line by IC<sub>50</sub> of 15,700.8 μM, 32,203.2 μM, and 111,760.1 μM, respectively. Thereafter, the tubulin polymerization inhibitory activity of these three compounds in combination with colchicine, as positive control of tubulin inhibitor was investigated. The related IC<sub>50</sub> values were found to be 0,170.0, 0.1 μM, 11,180.23 μM, 36,720.1, 33 μM, and 0,19 ± 0,01 μM for **1**-**2**-a, **1**-**2**-b, **1**-**2**-d and colchicine, respectively.

**Conclusion:** To sum up, the obtained results of the present study showed suitable correlation between cytotoxicity effect and tubulin polymerization inhibitory activity as well as the results of docking studies (in terms of binding energy and the ability to interact with Cys351 of tubulin binding site of tubulin).

**Keywords:** 3,4,5-trimethoxyphenyl, Schiff base, cytotoxicity, tubulin polymerization inhibitory activity





دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گرگان  
دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم مریم اسفندیاری دانشجوی داروسازی ورودی ۹۱ به شماره: ۱۰۳۱

لخت عنوان:

"بررسی اثربخشی داروهای ۳،۴،۵-تری متیلفیل فیل ترکیب

4-(2,3-dichlorophenyl)methylideneamino)-5-(3,4,5-

trimethoxyphenyl)methyl-23-(1,2,4-triazole-3-thione

بر روی اثرات باکتریایی و مهارت‌کنندگی پمپ‌های یون توبلین"

استاد راهنما:

۱- دکتر عالیہ عامری  
۲- دکتر حمید فروتن فر

هیئت محترم داوران به ترتیب حروف الفبا:

۱- دکتر میترا اجعفریان رضایی

۲- دکتر بهزاد بهنام

۳- دکتر عبدالرضا حسن زاده

۴- دکتر مجتبی شیبایی

۵- دکتر احسان فقیه میرزایی

در تاریخ ۹۷/۰۹/۱۳ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۹،۱۰

(با حروف) ۱۹،۱۰ به تصویب رسید.

دکتر معقوب بیورخشانی  
رئیس اداره پایان نامه

دکتر محمودرضا حدادی  
رئیس دانشکده

